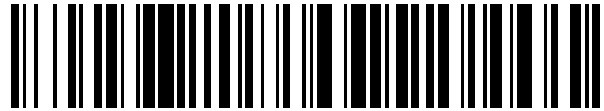


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 920**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011 E 11743078 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2603605**

54 Título: **Método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino como una enfermedad de Crohn o como una colitis ulcerosa**

30 Prioridad:

13.08.2010 EP 10305889

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2015

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (50.0%)

72 Inventor/es:

OGIER-DENIS, ERIC y

TRETON, XAVIER

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 534 920 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino como una enfermedad de Crohn o como una colitis ulcerosa

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente como una enfermedad de Crohn o como una colitis ulcerosa.

10

Estado de la técnica

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), tales como enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) son trastornos crónicos graves y recidivantes mediados por el sistema inmunológico del tracto gastrointestinal. Las EII son enfermedades heterogéneas caracterizadas por diversas anomalías genéticas que conducen a respuestas inflamatorias excesivamente agresivas a un subconjunto de bacterias entéricas comensales.

15

La enfermedad de Crohn puede afectar a todas las partes del tracto digestivo y especialmente al íleon y/o al colon y conduce a ulceraciones de la mucosa, fístula, e infiltración profunda de células inflamatorias en la pared intestinal.

20

La colitis ulcerosa con frecuencia implica a la parte inferior del colon y el recto y la inflamación de la mucosa puede extenderse al ciego en un patrón contiguo.

25

En la práctica clínica, del 20 al 30 % de los pacientes con colitis de EII no pueden clasificarse como EC o CU basándose en criterios endoscópicos, radiológicos e histopatológicos habituales, aunque esta distinción puede ser crucial para guiar las elecciones terapéuticas, especialmente cuando se analiza la resección colónica.

30

De forma similar, la sensibilidad de los marcadores serológicos (autoanticuerpos para neutrófilos [ANCA, pANCA] y anticuerpos antimicrobianos [ASCA, anti-OmpC, anti-I2, y anti-CBir1]) sigue siendo insuficiente para diferenciar entre EC y CU. Por otro lado, la etiología de las EII y la causa del brote siguen siendo en gran medida desconocidas y también se necesitan marcadores bioespecíficos de EC y CU para evaluar un diagnóstico temprano. Hasta la fecha, sigue siendo difícil elegir biomarcadores estrictamente específicos.

35

Algunas identificaciones específicas de la expresión de miARN en la mucosa colónica de pacientes con EII ya se han desvelado en la técnica anterior (X. Treton*, M. Fasseu, E. Pedruzzi, Y. Bouhnik, T. Aparicio, D. Cazals-Hatem, F. Daniel, M. Laburthe, A. Grover, E. Ogierdenis: "P0273: Alteration Of MicroRNA Expression In Inflamed And Inactive Colonic Mucosa Of Patients With Inflammatory Bowel Disease", Gastro 2009- Uegw/Wcogh, Londres, 20 de Noviembre de 2009 (20-11-2009), - 25 de Noviembre de 2009 (25-11-2009); TRETON ET AL: "P217 SPECIFIC ALTERATION OF MICRO-RNA EXPRESSION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE", JOURNAL OF CROHN'S AND COLITIS, vol. 2, N° 1, 1 de Febrero de 2008 (01-02-2008), página S69; Treton et al.: "Alteration de l'expression des microARN dans la muqueuse colique quiescente de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)", 26 de Marzo de 2010 (26-03-2010); y el documento WO 2009/120877). Sin embargo dichas identificaciones no permiten al mismo tiempo el diagnóstico de EII (EII frente a sano) y el diagnóstico diferencial de CU y EC.

45

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente como una EC o como una CU, comprendiendo dicho método:

50

i) una etapa de medir un perfil de expresión de miARN en una muestra aislada en mucosa no inflamada del colon del paciente, en la que dichos miARN son miR15a, miR26a, miR29a, miR29b, miR30c, miR126*, miR127-3p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146a, miR-146b-5p, miR150, miR-181d, miR-182, miR185, miR196a, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR-203, miR223, miR-299-5p, miR320a, miR324-3p, y miR-328 y

55

ii) una etapa que consiste en comparar el perfil de expresión de dichos miARN en la muestra del paciente con perfiles de control de dichos miARN, en la que una diferencia o similitud entre dichos perfiles de expresión es indicativa de una enfermedad de Crohn o de una colitis ulcerosa.

Descripción detallada de la invención

60

El objetivo de los inventores fue localizar alteraciones de la expresión génica de miARN en la mucosa colónica quiescente no inflamada de pacientes con EII frente a la de individuos sanos. En consecuencia, han estudiado alteraciones de todo el genoma en el patrón de expresión génica de miARN en mucosa quiescente de pacientes con CU y EC activas, en comparación con tejido sano normal. Han identificado subconjuntos de 22 (CU) y 34 (EC) miARN con expresión elevadamente alterada en tejido mucoso quiescente, estando 10 desregulados habitualmente en tejidos con CU y EC no inflamados (Tabla B). Más particularmente, los inventores seleccionaron 15 miARN para

65

los que la expresión fue estadísticamente diferente en biopsias colónicas no inflamadas de pacientes con CU y EC (véase la Tabla B y la Figura 1). Estos miARN y los 10 que están habitualmente desregulados en tejidos con CU y EC no inflamados se ensayaron después con respecto a su capacidad para diferenciar entre EC y CU. Basándose en la clasificación clínica del panel de pacientes como CU o EC, la selección de los 25 miARN fue capaz de predecir 15/16 en su verdadera clase (Tabla V).

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente como una enfermedad de Crohn o como una colitis ulcerosa, comprendiendo dicho método una etapa de medir un perfil de expresión de miARN en una muestra del paciente, en la que dichos miARN son miR15a, miR26a, miR29a, miR29b, miR30c, miR126*, miR127-3p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146a, miR-146b-5p, miR150, miR-181d, miR-182, miR185, miR196a, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR-203, miR223, miR-299-5p, miR320a, miR324-3p, y miR-328.

El término "miARN" se refiere a moléculas de microARN maduras (ARN pequeños no codificantes) que son generalmente de 21 a 22 nucleótidos de longitud, incluso aunque se han indicado longitudes de 19 y hasta 23 nucleótidos. Los miARN se procesan cada uno a partir de moléculas de ARN precursoras más largas ("miARN precursor": pri-miARN y pre-miARN). Los pri-miARN se transcriben a partir de genes que no codifican proteínas o se incluyen en genes que codifican proteínas (dentro de intrones o exones no codificantes). Los "miARN precursores" se pliegan en estructuras en horquilla que contienen tallos con emparejamiento de bases imperfecto y se procesan en dos etapas, catalizadas en animales por dos endonucleasas de tipo ribonucleasa III denominadas Drosha y Dicer. El miARN procesado es típicamente una parte del tallo. Los miARN procesados (también denominados "miARN maduros") se ensamblan en complejos de ribonucleoproteínas grandes (miRISC) que reprimen de forma post-transcripcional (regulación negativa) a un gen o genes diana específicos.

Todos los miARN pertenecientes a la invención se conocen por sí mismos y sus secuencias están públicamente disponibles de la base de datos http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa. Los miARN de la invención se enumeran en la Tabla A:

TABLA A: miARN pertenecientes a la invención

miARN_Id	Número de Referencia	Secuencia	SEC ID Nº:
hsa-mir-15a	MIMAT0000068	uagcagcacauaaugguuugug	1
hsa-mir-26a	MIMAT0000082	uucaaguaauccaggauaggcu	2
hsa-mir-29a	MIMAT0000086	uagcaccaucugaaaucgguaa	3
hsa-mir-29b	MIMAT0000100	uagcaccauuugaaaucaguguu	4
hsa-mir-30c	MIMAT0000244	uguaaacauccuacacucucagc	5
hsa-mir-126*	MIMAT0000444	cauuuuuacuuuugguacgcg	6
hsa-mir-127-3p	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu	7
hsa-mir-146a	MIMAT0000449	ugagaacugaauuccauggguu	8
hsa-mir-150	MIMAT0000451	ucucccaacccuuguaccagug	9
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433	cauaaaguagaaagcacuacu	10
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434	uguaguguuuuccuacuuuagga	11
hsa-mir-146b-5p	MIMAT0002809	ugagaacugaauuccauaggcu	12
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	aacauucauuguugcgugggu	13
hsa-mir-182	MIMAT0000259	uuuggcaaugguagaacucacacu	14
hsa-mir-185	MIMAT0000455	uggagagaaggcaguuccuga	15
hsa-mir-196a	MIMAT0000226	uagguaguuucauguuguuggg	16
hsa-mir-199a-3p	MIMAT0000232	acaguagucugcacauugguaa	17
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	cccaguguucagacuaccuguuc	18
hsa-mir-199b-5p	MIMAT0000263	cccaguguuuagacuaucuguuc	19
hsa-mir-203	MIMAT0000264	gugaaauguuuaggaccacuag	20

hsa-mir-223	MIMAT0000280	ugucaguuuugucaaaauacccca	21
hsa-mir-299-5p	MIMAT0002890	ugguuuaccgucccacauacau	22
hsa-mir-320	MIMAT0000510	aaaagcuggguugagagggcgga	23
hsa-mir-324-3p	MIMAT0000762	acugccccaggugcugcugg	24
hsa-mir-328	MIMAT0000752	cuggcccucucugcccuuccgu	25

Entre los 25 miARN de la Tabla A, se identificaron 10 como desregulados habitualmente en tejidos con CU y EC no inflamados y 15 fueron para los que la expresión era estadísticamente diferente en biopsias colónicas no inflamadas de pacientes con CU y EC (véase la Tabla B y la Figura 1). En consecuencia, los 10 miARN del perfil habitualmente desregulados en tejidos de CU y EC no inflamados permiten la confirmación de que el paciente está afectado por una enfermedad inflamatoria y los 15 restantes se usan para diferenciar entre CU y EC.

Tabla B: selección de los 25 miARN

miARN habitualmente desregulados en tejidos con CU y EC no inflamados	miR-15a, miR-26a, miR-29a, miR-29b, miR-30c, miR-126*, miR-127-3p, miR-185, miR-196a, miR-324-3p
miARN que diferencian entre CU y EC	miR-146b-5p, miR150, miR-181d, miR-182, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR-203, miR223, miR-299-5p, miR320a, miR-146a, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-328

La expresión "perfil de miARN" se refiere a un conjunto de datos referentes al patrón de expresión de los miARN de la Tabla A en la muestra.

El término "muestra" significa cualquier muestra derivada del colon del paciente, que comprende células mucosas. Dicha muestra se obtiene con la finalidad de la evaluación *in vitro*. En una realización particular, la muestra resulta de una biopsia endoscópica realizada en el colon del paciente. Dicha biopsia endoscópica puede tomarse de diversas áreas del colon. En otra realización particular, la muestra puede aislarse de mucosa no inflamada del colon del paciente. En consecuencia, la invasividad del método de acuerdo con la invención está relativamente limitada sin la necesidad de anestesiarse al paciente o de purgar los intestinos del paciente.

En otra realización particular la muestra puede tratarse antes de su uso, por ejemplo para evitar la degradación de ácidos nucleicos. Se conocen por el experto en la materia técnicas de lisis celular, concentración o dilución de ácidos nucleicos.

La medición del perfil de expresión del miARN en la muestra obtenida del paciente puede llevarse a cabo mediante una diversidad de técnicas.

Por ejemplo los ácidos ribonucleicos contenidos en las muestras (por ejemplo, célula o tejido preparado a partir del paciente) se extraen en primer lugar de acuerdo con métodos convencionales solos o en combinación (por ejemplo, soluciones de lisis basadas en enzimas líticas o reactivos químicos o resinas de unión a ácido nucleico), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los miARN extraídos se detectan después por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa en tiempo real. La RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa. Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).

En una realización particular, la determinación comprende hibridar la muestra con reactivos selectivos tales como sondas o cebadores y detectar de este modo la presencia, o medir la cantidad de miARN originalmente en la muestra. Puede realizarse hibridación mediante cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vaso, columna y así sucesivamente. En realizaciones específicas, la hibridación se realiza en un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una matriz de miARN. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nylon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tales como un portaobjetos, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. La hibridación puede realizarse en cualquier condición adecuada para un complejo detectable, tal como un híbrido de miARN, para formarse entre el reactivo y el miARN de la muestra.

Los ácidos nucleicos que muestran complementariedad u homología de secuencia con los miARN de interés en el presente documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que no es necesario que dichos ácidos nucleicos sean idénticos, pero son típicamente al menos aproximadamente un 80

% idénticos con la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente un 85 % idénticos y aún más preferentemente un 90-95 % idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios adecuados, tales como un marcador detectable para detectar la hibridación. Se conocen en la técnica una amplia diversidad de indicadores apropiados incluyendo ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros (por ejemplo avidina/biotina).

Las sondas y cebadores son "específicos" para los miARN con los que hibridan, es decir, preferentemente hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondientes a la mayor temperatura de fusión, T_m, por ejemplo, formamida 50 %, SCC 5x o 6x. SCC 1x es un NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M).

En consecuencia, la presente invención se refiere a la preparación y uso de matrices de miARN o matrices de sondas de miARN, que son macro matrices o micromatrices de moléculas de ácido nucleico (sondas) que son total o prácticamente complementarias o idénticas a una pluralidad de moléculas de miARN posicionadas sobre un soporte o material de soporte en una organización separada espacialmente. Las macro matrices son típicamente láminas de nitrocelulosa o nylon sobre las que se han aplicado puntualmente sondas. Las micromatrices sitúan las sondas de ácido nucleico más densamente de tal forma que puedan ajustarse hasta 10.000 moléculas de ácido nucleico en una región típicamente de 1 a 4 centímetros cuadrados. Las micromatrices pueden fabricarse aplicando puntualmente moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, genes, oligonucleótidos, etc., sobre sustratos o sintetizando secuencias oligonucleotídicas *in situ* sobre un sustrato. Las moléculas de ácido nucleico aplicadas puntualmente o sintetizadas *in situ* pueden aplicarse en un patrón de matriz de alta densidad de hasta aproximadamente 30 moléculas de ácido nucleico no idénticas por centímetro cuadrado o más, por ejemplo hasta aproximadamente 100 o incluso 1000 por centímetro cuadrado. Las micromatrices típicamente usan vidrio recubierto como soporte sólido, a diferencia del material basado en nitrocelulosa o nylon de las matrices de filtro. Teniendo una matriz ordenada de muestras de ácido nucleico complementarias de miARN, la posición de cada miARN puede seguirse y ligarse a la muestra original. Los expertos en la materia conocen una diversidad de dispositivos de matriz diferentes en los que se asocian de manera estable una pluralidad de sondas de ácido nucleico distintas con la superficie de un soporte sólido. Los sustratos útiles para matrices incluyen nylon, vidrio, metal, plástico, látex y silicio. Dichas matrices pueden variar de maneras diferentes, incluyendo longitud media de la sonda, secuencia o tipos de sondas, naturaleza del enlace entre la sonda y la superficie de la matriz, por ejemplo covalente o no covalente, y similares.

Después de prepararse una matriz o un conjunto de sondas de miARN y/o marcarse el miARN en la muestra o la sonda de miARN, la población de ácidos nucleicos diana se hibrida con la matriz o sondas en condiciones de hibridación, donde dichas condiciones puedan ajustarse, según se desee, para proporcionar un nivel óptimo de especificidad a la vista del ensayo particular que se realice. Se conocen bien por los expertos en la materia condiciones de hibridación adecuadas y se revisan en *Sambrook et al. (2001)*. Es de particular interés en muchas realizaciones el uso de condiciones rigurosas durante la hibridación. Los expertos en la materia conocen condiciones rigurosas.

Como alternativa, puede realizarse un método de cuantificación de miARN usando cebadores de tallo-bucle para transcripción inversa (RT), seguido de una sonda TaqMan® en tiempo real. Típicamente, dicho método comprende una primera etapa en la que los cebadores de tallo-bucle se hibridan con dianas de miARN y se extienden en presencia de transcriptasa inversa. Después se usan un cebador directo, sonda TaqMan®, y cebador inverso específicos de miARN para reacciones de PCR. La cuantificación de miARN se estima basándose en los valores de CT medidos.

Están disponibles en el mercado muchos ensayos de cuantificación de miARN a través de *Qiagen (S.A. Courtaboeuf, Francia)* o de *Applied Biosystems (Foster City, Estados Unidos)*.

El perfil de expresión de un miARN puede expresarse como un perfil de expresión absoluto o perfil de expresión normalizado. Típicamente, los perfiles de expresión se normalizan corrigiendo el perfil de expresión absoluto de un miARN comparando su expresión con la expresión de un ARNm que no es relevante, por ejemplo, un ARNm constitutivo que se expresa de forma constitutiva. El ARNm adecuado para normalización incluye ARNm constitutivos tales como el U6, U24, U48 y S18. Esta normalización permite la comparación del perfil de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra, o entre muestras de diferentes fuentes.

El método de la invención comprende además una etapa que compara el perfil de expresión de dichos miARN en la muestra del paciente con un perfil de referencia de dichos miARN, en la que una diferencia o similitud entre dichos perfiles de expresión es indicativa de una enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa. El perfil de referencia de acuerdo con la invención es específico de la enfermedad. El perfil de referencia puede consistir por lo tanto en el perfil de expresión de dichos miARN en un tejido de referencia tal como un tejido representativo de una enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa. En consecuencia, los perfiles de referencia pueden predeterminarse llevando a cabo un método que comprende las etapas de a) proporcionar al menos una colección de muestras tisulares de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, b) determinar para cada muestra tisular comprendida en dicha colección el perfil de expresión de dichos miARN.

Los perfiles de referencia indicativos de CU y EC típicos se representan en la Tabla C.

Tabla C: perfiles de referencia de CU y EC

miARN	Expresión relativa en EC	Expresión relativa en CU
miR15a	Regulado positivamente (+ 8)	Regulado positivamente (+ 7)
miR26a	Regulado positivamente (+ 12)	Regulado positivamente (+ 9,5)
miR29a	Regulado positivamente (+ 14)	Regulado positivamente (+ 10)
miR29b	Regulado positivamente (+ 14)	Regulado positivamente (+ 10)
miR30c	Regulado positivamente (+ 8)	Regulado positivamente (+ 8)
miR126*	Regulado positivamente (+ 20)	Regulado positivamente (+ 16)
miR127-3p	Regulado positivamente (+ 11)	Regulado positivamente (+ 9)
miR185	Regulado positivamente (+ 10)	Regulado positivamente (+ 7)
miR196a	Regulado positivamente (+ 16)	Regulado positivamente (+ 7)
miR324-3p	Regulado positivamente (+ 11)	Regulado positivamente (+ 10)
miR-146b-5p	Regulado negativamente	No desregulado
miR150	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR-181d	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR-182	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR199a-3p	No desregulado	Regulado negativamente
miR199a-5p	Regulado negativamente (- 2)	Regulado negativamente (- 10)
miR199b-5p	Regulado negativamente	Regulado positivamente
miR-203	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR223	Regulado positivamente (+ 8)	Regulado negativamente (+ 2,5)
miR-299-5p	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR320a	No desregulado	Regulado negativamente
miR-146a	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR-142-3p	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR-142-5p	Regulado positivamente	Regulado negativamente
miR-328	Regulado positivamente	Regulado negativamente

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regulado positivamente" significa que la expresión de miARN correspondiente está regulada positivamente en comparación con la expresión determinada en general en un paciente sano (por ejemplo un paciente no afectado por una EII).

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regulado negativamente" significa que la expresión del miARN correspondiente está regulada negativamente en comparación con la expresión determinada generalmente en un paciente sano (por ejemplo un paciente no afectado por una EII).

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "no desregulado" significa que la expresión del miARN correspondiente está al mismo nivel que la expresión determinada en general en un paciente sano (por ejemplo un paciente no afectado por una EII).

20 Como alternativa, el perfil de expresión puede expresarse como una puntuación. Por ejemplo dicha puntuación puede obtenerse i) determinando para cada miARN del perfil su nivel de expresión en la muestra, ii) asignando para cada miARN un coeficiente (por ejemplo un coeficiente positivo cuando esté regulado positivamente o negativo cuando esté regulado negativamente). La ventaja de dicha puntuación es facilitar la etapa de comparación con los perfiles de referencia que pueden expresarse como "valores de corte". Por ejemplo el valor ("de corte") de referencia

representa la puntuación calculada para el perfil en una muestra tisular representativa de CU o EC. Los valores de corte también pueden predeterminarse llevando a cabo el método de la invención para muestra tisular representativa de CU o EC. En una realización en particular, los valores punto de corte como se han descrito anteriormente pueden presentarse en una tabla, de modo que el médico pueda comparar la puntuación obtenida para un paciente con dichos valores y pueda determinar fácilmente si el paciente tiene CU o EC.

Un objeto adicional de la divulgación se refiere a un kit para realizar los métodos de la invención, en el que dicho kit comprende medios para medir el perfil de expresión de miARN en la muestra obtenida del paciente. Los kits pueden incluir sondas, cebadores, macromatrices o micromatrices como se han descrito anteriormente.

Por ejemplo, el kit puede comprender un conjunto de sondas de miARN como se han definido anteriormente, habitualmente compuestas de ADN, y que pueden estar previamente marcadas. Como alternativa, las sondas pueden no estar marcadas y los ingredientes para el marcaje pueden incluirse en el kit en recipientes separados. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales envasados convenientemente necesarios para el protocolo de hibridación concreto, incluyendo matrices de fase sólida, si es aplicable, y patrones.

Como alternativa el kit puede comprender cebadores de amplificación (por ejemplo cebadores de bucle-tallo) que pueden estar marcados previamente o pueden contener un resto de unión o purificación de afinidad. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales envasados convenientemente necesarios para el protocolo de amplificación concreto.

La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deberían interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Descripción de la figura

Figura 1: miARN con expresión alterada diferencialmente en tejidos con CU y EC no inflamados: análisis de representación de caja y bigotes. Se midió la expresión de miARN en mucosa colónica no inflamada obtenida de pacientes con CU y EC (8 pacientes/EII) y calculó frente a la medida en controles sanos. Los datos correspondientes a 6 miARN (mir-150, mir-196b, mir-199a-3p, mir-199b-5p, mir-223 y mir-320a) con alteración estadísticamente diferente de la expresión en tejidos mucosos con CU y EC se presentan como representaciones de caja y bigotes (caja, 25-75 %; bigotes, 10-90 %; línea, mediana); $p < 0,05$.

Ejemplo: La expresión génica de miARN está alterada en biopsias colónicas tanto de CU como de EC

Material y Métodos:

Pacientes con EII y controles: se obtuvieron muestras de biopsia colónica en el transcurso del examen endoscópico de pacientes con EC y CU de leve a grave y de individuos sanos que se someten a colonoscopias de exploración (Tabla I) (protocolo aprobado por el Comité de Ética Local).

Tabla I: Características de pacientes con EC o CU

	Colitis ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Nº de pacientes	8	8
Hombres/Mujeres	5 / 3	4 / 4
Edad (*a)		
Media	45,9	37,6
Intervalo	33 - 57	20 - 58
Duración de la enfermedad (a)		
Media	10,5	8,8
Intervalo	1 - 21	0,5 - 23
# Medicaciones (%)		
5 ASA	6 (75)	2 (25)
CS	-	2 (25)
AZA	1 (13)	2 (25)
MTX, IFX	-	1 (13)

CS, 5 ASA	1 (13)	-
Ninguna	-	1 (13)

*a, años; # Medicaciones: CS: esteroides / 5 ASA: 5 aminosalicilatos / AZA: azatioprina / IFX: infliximab / MTX: metotrexato.

Se evaluó la actividad de enfermedad clínica para EC y CU de acuerdo con los índices de Harvey-Bradshaw y el de Actividad de Colitis (CAI), respectivamente. En cada paciente con EII, se perforó de forma endoscópica áreas no inflamadas (quiescentes) e inflamadas de tejido colónico (5 biopsias/área). Se asignaron tres biopsias de cada área para inmersión en RNAlater™ inmediata, después se congelaron instantáneamente y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se apartaron dos para examen histopatológico. Para la recogida de biopsias, las áreas quiescentes inflamadas estaban separadas por más de 20 cm a lo largo del colon. En controles sanos, se perforaron 5 biopsias en el colon tanto derecho como izquierdo y se procesaron como anteriormente. Se procesaron 260 biopsias en total.

5 **Análisis histopatológicos:** Las biopsias se tiñeron rutinariamente con hematoxilina y eosina. Las evaluaciones histológicas del daño a la mucosa e infiltración de células inflamatorias se clasificaron por el mismo patólogo gastrointestinal experto, usando una puntuación previamente validada para caracterizar la implicación colónica tanto de CU como de EC. Las alteraciones en la expresión génica de miARN se estudiaron siguiendo esta guía histológica.

15 **Aislamiento de ARN:** Se extrajeron ARN totales de biopsias con reactivo TRIzol® (Invitrogen), después se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) y se evaluó la pureza/integridad usando microplacas de ARN desechables (kit *Agilent RNA 6000 Nano LabChip*) y un bioanalizador Agilent 2100 (*Agilent Technologies, Waldbrunn, Alemania*). Solamente se procesaron adicionalmente las preparaciones con RIN > 7 para análisis de la expresión de miARN.

20 **Q-PCR de transcripción inversa y en tiempo real:** Se usó el kit de acceso temprano de panel humano (ensayo de microARN TaqMan®; *Applied Biosystems*) diseñado para cuantificar 321 miARN humanos maduros. Se generó ADNc a partir de 10 ng de ARN total usando cebadores de RT de tallo-bucle específicos de miARN. Se realizaron ensayos de Q-PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando alícuotas de ADNc equivalentes a ~ 1,3 ng de ARN total y se procesaron en un dispositivo Light Cycler 480 (*Roche Diagnostics*).

25 **Normalización de los resultados de PCR cuantitativa en tiempo real:** Se ensayaron varios ARN (U6, U24, U48 y S18) como patrones potenciales y se descubrió que U6 (un ARN nuclear pequeño ubicuo) era el más fiable. La expresión de miARN se calculó por lo tanto en relación con la de U6 y se usó un método de ciclo de umbral comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) para comparar tejidos con EII inflamados y no inflamados con controles sanos.

30 **Análisis estadístico:** Se compararon grupos despareados de valores de acuerdo con el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico. La significación estadística se estableció a $p < 0,05$.

35 **Resultados**

El objetivo en la investigación de las alteraciones de la expresión miARN en tejidos con EII era comprobar modificaciones específicas que pudieran explicar la disfunción celular epitelial temprana en la mucosa colónica quiescente de pacientes con CU y EC (Tabla I). Los inventores se han centrado por lo tanto en las biopsias de grados 0 y 1, pero también se estudiaron los grados 2-4 (mucosa inflamada) para comparación de ambos estadios de la enfermedad.

La expresión de miARN se cuantificó por ensayo de miARN de Q-PCR en tiempo real. Midiendo la abundancia de 321 transcritos de miARN humanos ($2^{-\Delta C_T}$), los experimentos preliminares mostraron que no se observaban diferencias significativas entre el colon derecho e izquierdo en tejidos de control sanos.

De acuerdo con los criterios rigurosos de los inventores para la selección de miARN con expresión génica alterada ($10 \times \log_{10} 2^{-\Delta\Delta C_T} > 7$ o < -7), las regulaciones positivas y negativas se equilibraron en tejidos con CU (51,7 % y 48,3 %, respectivamente), mientras que la amplia mayoría de miARN alterados (85,4 %) estaba regulado positivamente en tejidos con EC.

45 **Tejidos con CU:** 173 miARN se expresaron por encima del nivel de detección ($C_T < 35$) en tejidos con CU. Veintidós miARN se expresaron diferencialmente cuando se compararon tejidos con CU no inflamados y tejidos de control sanos, estando 10 y 12 regulados positiva y negativamente, respectivamente. Diecisiete miARN (todos excepto mir-185, 196a, 214, 376a, 424 que no cumplieron los criterios de selección de los inventores) presentaron expresión desregulada similar en mucosa con CU quiescente e inflamada.

55 **Tejidos con EC:** Se expresaron 204 miARN por encima del nivel de detección en tejidos con EC. Treinta y cuatro miARN se identificaron como expresados diferencialmente cuando se compararon tejidos con EC no inflamados y tejidos de control sanos, estando 34 regulados positiva y negativamente, respectivamente. Veintiocho miARN (todos excepto mir-9*, 30a*, 30c, 223, 374a, 451 que no cumplieron los criterios de selección de los inventores) presentaron expresión desregulada similar en mucosa con EC quiescente e inflamada. Finalmente también se

observaron alteraciones en la expresión génica de miARN específica para tejidos con CU o EC inflamados (7 y 13 miARN, respectivamente).

5 *Tejidos con CU y EC:* 10 miARN compartían expresión alterada común en tejidos con CU y EC no inflamados, de los que 7 (todos excepto mir-30c, 185 y 196a) también se sobre-expresaban en biopsias inflamadas tanto con CU como con EC (Tabla II)

Tabla II: Alteraciones compartidas de la expresión génica de miARN en pacientes con CU y EC

miARN_Id	Nº de referencia	Expresión relativa frente a controles sanos	
		UC no inflamada	EC no inflamada
		Media ± Etm	Media ± Etm
hsa-mir-26a	MIMAT0000082	9,478 ± 2,917	12,881 ± 1,217
hsa-miR-29a	MIMAT0000086	10,506 ± 2,428	14,166 ± 1,060
hsa-miR-29b	MIMAT0000100	10,448 ± 2,176	14,671 ± 1,429
hsa-miR-126*	MIMAT0000444	16,966 ± 2,750	20,311 ± 3,150
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	8,900 ± 2,377	11,057 ± 1,259
hsa-mir-15a	MIMAT0000068	7,275 ± 2,509	8,206 ± 3,514
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	9,929 ± 2,543	11,947 ± 1,243
<i>hsa-mir-30c</i>	<i>MIMAT0000244</i>	<i>8,389 ± 2,596</i>	<i>8,190 ± 1,663</i>
<i>hsa-mir-185</i>	<i>MIMAT0000455</i>	<i>7,325 ± 3,144</i>	<i>10,018 ± 4,030</i>
<i>hsa-mir-196a</i>	<i>MIMAT0000226</i>	<i>7,202 ± 4,389</i>	<i>16,216 ± 1,205</i>

La expresión de miARN se calculó frente a la medida en controles sanos. Se enumeran los miARN con sobre-expresión compartida en relación con valores de punto de corte ($10 \times \log_{10} 2^{\Delta\Delta CT} > 7$) en tejidos no inflamados tanto con UC como con EC. Nº de referencia, Nº de identificación de MIMAT; Media ± Etm (5-8 pacientes). Cursivas (3 últimas filas), miARN que no se sobre-expresaban en CU (mir-185, 196a) o EC (mir-30c) inflamados.

10 Además, 11 miARN mostraron alteración de la expresión definida en UC y EC quiescentes (Figura 1):

Tabla III: miARN con alteraciones definidas de la expresión génica en pacientes con CU y EC

miARN_Id	Nº de referencia	CU frente a EC	
		p*	Número de pacientes
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	0,0458	8 pacientes
hsa-mir-150	MIMAT0000451	0,0273	8 pacientes
hsa-mir-223	MIMAT0000280	0,0357	8 pacientes
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	0,0460	8 pacientes
hsa-mir-203	MIMAT0000264	0,0357	8 pacientes
hsa-mir-299-5p	MIMAT0002890	0,0356	8 pacientes
hsa-mir-182	MIMAT0000259	0,0283	5 pacientes
hsa-mir-320	MIMAT0000510	0,0163	5 pacientes
hsa-mir-199a-3p	MIMAT0000232	0,0472	5 pacientes
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	0,0283	5 pacientes
hsa-mir-199b-5p	MIMAT0000263	0,0283	5 pacientes

Finalmente, se analizó la expresión de miARN alterada en biopsias colónicas no inflamadas de pacientes con EC y CU usando un método de clasificación no supervisada (Selección de Marcador Comparativa; calculado en línea en el servidor de GenePattern alojado en el sitio web del "Instituto Broad"; <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>). Esto permitió la selección de 4 miARN adicionales que ayudaban a diferenciar entre EC y CU, aunque no cumplían los criterios anteriormente mencionados para la selección de miARN ($10 \times \text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} > 7$ o < -7) (Tabla IV).

5

Tabla IV

miARN_id	Nº de referencia
hsa-mir-146a	MIMAT0000449
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433
hsa-mir-328	MIMAT0000752

10 Cuando se ensaya usando una clasificación de vecino más cercano K con algoritmo de validación cruzada dejando uno fuera (validación KN-NX; calculado en línea en el servidor GenePattern alojado en el sitio web del "Instituto Broad"; <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>) el conjunto de 15 miARN presentados en las Tablas III y IV permitió la clasificación correcta de 15 de 16 pacientes (véase Tabla V a continuación).

15

Tabla V

Muestras	Clase Verdadera	Clase Predicha (KNNXVal)	¿Correcto?
CD_Sain_28	Ec	Cu	Falso
CD_Sain_102	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_111	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_120	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_130	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_137	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_158	Ec	Ec	Verdadero
CD_Sain_160	Ec	Ec	Verdadero
UC_Sain_107 BI	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_125	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_121	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_114	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_109	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_13	Cu posteriormente reclassificado clínicamente como EC	Ec	Verdadero
UC_Sain_15	Cu	Cu	Verdadero
UC_Sain_132	Cu	Cu	Verdadero

En su conjunto, estos datos muestran de forma inequívoca que la expresión génica de miARN alterada existe previamente en tejidos con CU y EC no inflamados. Apoyan la noción de que la expresión génica de miARN desregulada puede desempeñar un papel clave en la sensibilización de tejido mucoso quiescente a la inflamación en respuesta a factores ambientales o a inductores de EII, contribuyendo de este modo a la aparición y/o recaída de inflamación.

20

Además, los inventores anticipan que la caracterización de la expresión de miARN alterada en muestras de biopsia colónica de pacientes con EII (área no inflamada) puede resultar ser una herramienta de diagnóstico útil. Los 10 miARN con sobreexpresión alterada habitual tanto en EC como en CU pueden ayudar a distinguir a estos pacientes de los individuos sanos. Los 15 miARN presentados en las Tablas III y IV deberían resultar útiles para diferenciar entre pacientes con EC y CU.

25

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que concierne la presente invención.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

10

<120> UN MÉTODO PARA CLASIFICAR UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO COMO UNA ENFERMEDADE CROHN O COMO UNA COLISTIS ULCEROSA

<130> BIO08361 OGIERDENIS/MC

15

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 1

uagcagcaca uaaugguuug ug 22

<210> 2

<211> 22

<212> ARN

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

uucaaguaau ccaggauagg cu 22

35

<210> 3

<211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 3

uagcaccauc ugaaucggu ua 22

<210> 4

<211> 23

<212> ARN

45

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

uagcaccuu ugaaucagu guu 23

50

<210> 5

<211> 23

<212> ARN

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

uguaaacauc cuacacucuc agc 23

60

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

65

<400> 6

cauuuuacu uuugguacgc g 21

	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5		
	<400> 7	
	ucggauccgu cugagcuugg cu	22
10		
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15		
	<400> 8	
	ugagaacuga auuccauggg uu	22
20		
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
	ucucccaacc cuuguaccag ug	22
25		
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30		
	<400> 10	
	cauaaaguag aaagcacuac u	21
35		
	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
	uguaguguuu ccuacuuuau gga	23
40		
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45		
	<400> 12	
	ugagaacuga auuccauagg cu	22
50		
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55		
	<400> 13	
	aacaucauu guugucggug ggu	23
60		
	<210> 14	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
	uuuggcaaug guagaacuca cacu	24
65		
	<210> 15	
	<211> 22	

ES 2 534 920 T3

	<212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 15 uggagagaaa ggcaguuccu ga	22
10	<210> 16 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 16 uagguaguuu cauguuguug gg	22
20	<210> 17 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 17 acaguagucu gcacauuggu ua	22
30	<210> 18 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 18 cccaguguuc agacuaccug uuc	23
40	<210> 19 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 19 cccaguguuu agacuaucug uuc	23
50	<210> 20 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 20 gugaaauguu uaggaccacu ag	22
60	<210> 21 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 21 ugucaguuuug ucaaaauacc ca	22
70	<210> 22 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
75	<400> 22 ugguuuaccg ucccacauac au	22
80	<210> 23 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 534 920 T3

<400> 23
aaaagcuggg uugagagggc ga 22

5 <210> 24
<211> 20
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 24
acugcccag gugcugcugg 20

15 <210> 25
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 25
cuggcccucu cugcccuucc gu 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para clasificar una enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente como enfermedad de Crohn o como colitis ulcerosa, comprendiendo dicho método:
- 10 i) una etapa de medir un perfil de expresión de miARN en una muestra aislada en mucosa no inflamada del colon del paciente, en la que dichos miARN son miR15a, miR26a, miR29a, miR29b, miR30c, miR126*, miR127-3p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146a, miR-146b-5p, miR150, miR-181d, miR-182, miR185, miR196a, miR199a-3p, miR199a-5p, miR199b-5p, miR-203, miR223, miR-299-5p, miR320a, miR324-3p y miR-328 y
- 15 ii) una etapa que consiste en comparar el perfil de expresión de dichos miARN en la muestra del paciente con perfiles de control de dichos miARN, en la que una diferencia o similitud entre dichos perfiles de expresión es indicativa de una enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la muestra resulta de biopsias endoscópicas realizadas en el colon del paciente.

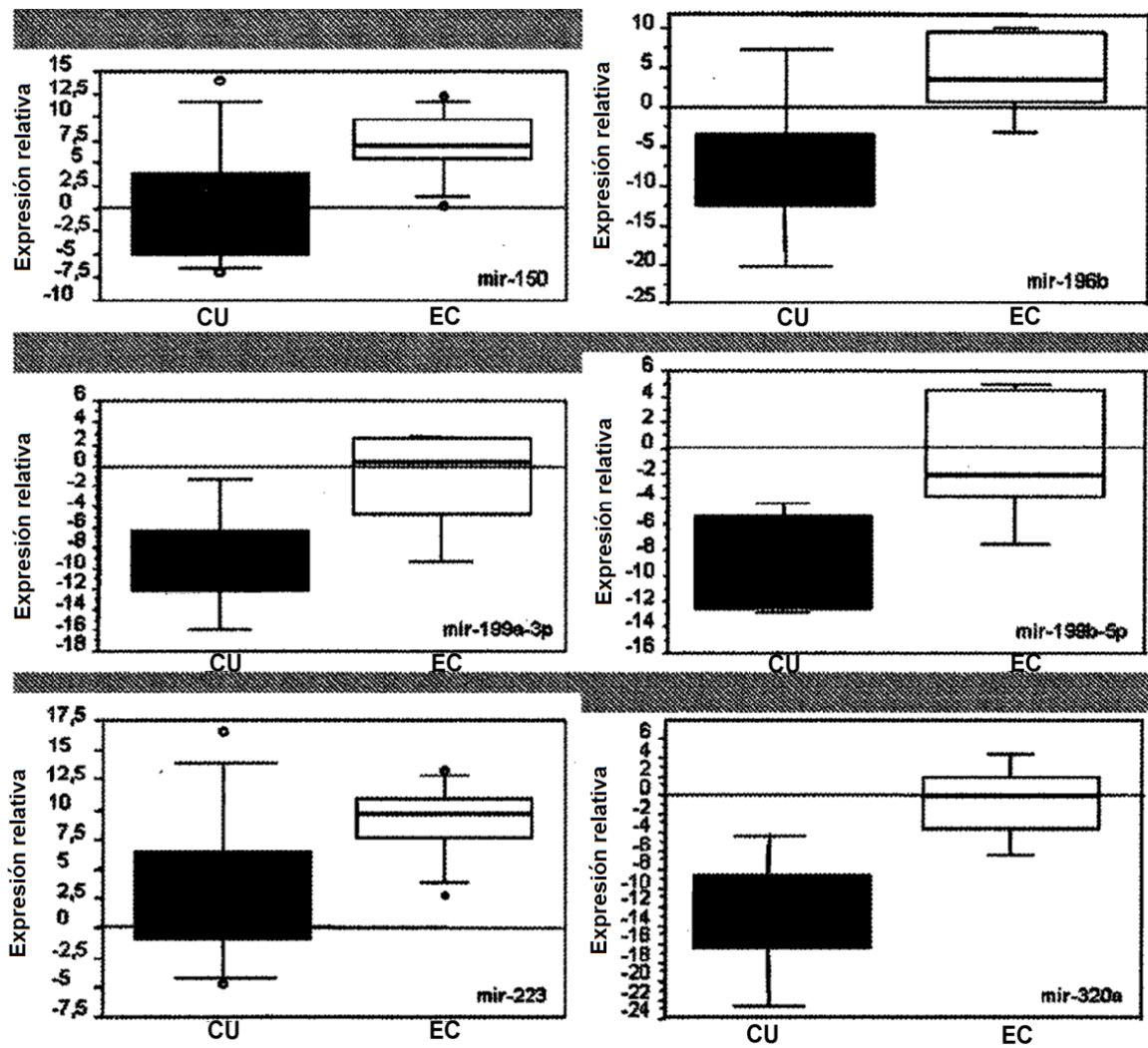


Figura 1